

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 625–628

Hydroxyprolinfraktionen im Blut

Von H. Struck und M. Nagelschmidt

Aus der Biochemischen und experimentellen Abteilung (Leiter: Prof. Dr. H. Struck) am II. Chirurgischen Lehrstuhl (Direktor: Prof. Dr. W. Schink) der Universität zu Köln in Köln-Merheim

(Eingegangen am 7. September 1976/26. Juli 1977)

Zusammenfassung: Es werden modifizierte Verfahren zur Bestimmung des gebundenen Hydroxyprolin im Blut dargestellt. Die fraktionierten und hydrolysierten Proben werden durch Austauscherchromatographie von störenden Substanzen befreit. Dabei werden die Verluste durch Zusatz von inneren Standards korrigiert. Durch mehrfaches Konzentrieren wird es möglich, mit geringen Probenvolumina zu arbeiten. Bis zu 6,12 $\mu\text{mol/l}$ freies und peptidgebundenes und 11,5 $\mu\text{mol/l}$ proteingebundenes Hydroxyprolin sind erfaßbar. Mit Hilfe der beschriebenen Verfahren werden die Hydroxyprolinfraktionen in einem menschlichen Sammelplasma sowie in Rattenserum gemessen.

Hydroxyproline fractions in blood

Summary: Modified methods for the determination of bound hydroxyproline in blood are presented. The fractionated and hydrolyzed samples are separated from interfering material by ion exchange chromatography. Internal standards are used to correct for recovery. After a several fold concentration of samples it is possible to work with reduced blood volumes. Up to 6.12 $\mu\text{mol/l}$ of free and peptide-bound and 11.5 $\mu\text{mol/l}$ of protein-bound hydroxyproline are detectable. Using the described methods hydroxyproline was determined in a pooled human plasma and in the sera of rats.

Einleitung

Hydroxyprolinbestimmungen in Harn und Serum wurden bisher benutzt, um Aussagen über den Kollagenstoffwechsel zu machen. Man bevorzugte vor allen Dingen die Bestimmung des Gesamthydroxyprolin im Harn, in letzter Zeit gewann aber auch die Bestimmung des freien Hydroxyprolin im Serum in zunehmendem Maße an Bedeutung.

Dagegen gibt es nur relativ wenige Untersuchungen über das im Serum vorhandene peptidgebundene und proteingebundene Hydroxyprolin. Man hielt diese beiden Fraktionen zunächst ebenfalls für Metaboliten des Kollagenstoffwechsels. Seit den Arbeiten von Müller-Eberhard, Yonemasu, Reid et al. (1–4) weiß man jedoch, daß neben dem Kollagen auch das C1q des Komplementsystems beträchtliche Mengen an Hydroxyprolin enthält.

Damit wurde es fragwürdig, ob man die verschiedenen Hydroxyprolinfraktionen in Harn und Serum weiterhin als Meßgrößen des Kollagenstoffwechsel ansehen darf. Es schien uns notwendig, unter den neugewonnenen Gesichtspunkten die Bedeutung der einzelnen Hydroxyprolinfraktionen im Serum zu überprüfen.

Die geplanten vergleichenden Untersuchungen an Kleintieren erforderten eine erhebliche Modifizierung der bisher beschriebenen Testmethoden für das gebundene Hydroxyprolin, die hier dargestellt werden soll.

Methodik

Reagenzien für die Bestimmungsreaktion

1. Puffer-Stammlösung, pH 6: in einem 250 ml Meßkolben mit etwas Wasser 12,5 g Citronensäure Monohydrat, 3 ml Essigsäure (16,9 mol/l), 30 g Natriumacetat $\times 3\text{H}_2\text{O}$ und 8,5 g Natriumhydroxyd lösen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen.
 - 1 a. Puffer für Chloramin T-Lösung: 100 ml Stammpuffer + 20 ml Wasser + 30 ml *n*-Propanol.
 - 1 b. Puffer für Farbreaktion: 20 ml Stammpuffer + 80 ml Wasser + 100 ml *n*-Propanol.
2. Chloramin T-Lösung: 282 mg Chloramin T in 2 ml Wasser lösen, 2 ml *n*-Propanol zugeben und das Volumen mit Puffer 1 a auf 50 ml bringen.
3. Farbreaenz: 3 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 12 ml *n*-Propanol suspendieren, anschließend 5,2 ml Perchlorsäure (8,78 mol/l) zugeben und auf 20 ml auffüllen.
4. Perchlorsäure (8,78 mol/l).
5. *n*-Propanol
6. Hydroxyprolin-Standardlösungen: durch Verdünnen mit Wasser aus einer Stammlösung (50 mg/l = 381 $\mu\text{mol/l}$, Fa. Organon Teknika GmbH., München) herstellen.

Die Hydroxyprolin-Standardlösungen werden täglich frisch bereitet, Lösung 3 ist bei 4°C 1 Woche haltbar, die anderen Lösungen können mindestens 3 Wochen lang benutzt werden.

Analytik

Bestimmung von freiem Hydroxyprolin

Probe:

0,2 ml Serum oder Plasma mit 1,0 ml Ethanol enteiweißen, zentrifugieren, 1,0 ml des Überstandes in ein Schliffreagenzglas überführen und am Rotationsverdampfer im Vakuum trocknen (Wasserbad: 40°C). Den Rückstand in 0,5 ml von Puffer 1 b lösen und Bestimmungsreaktion (s. u.) durchführen.

Standard:

0,2 ml einer Hydroxyprolin-Standardlösung (2 mg/l = 15,2 µmol/l) in gleicher Weise wie die Probe behandeln.

Bestimmung von freiem und peptidgebundenem Hydroxyprolin

Probe:

0,4 ml Serum oder Plasma mit 2,0 ml Ethanol enteiweißen. Nach dem Zentrifugieren 2,0 ml des Überstandes in ein Schliffreagenzglas geben und am Rotationsverdampfer trocknen. 3,0 ml HCl (6 mol/l) zugeben und 16 Stunden bei 105°C hydrolysieren. Anschließend Huminstoffe abfiltrieren. 2,0 ml des Filtrats in ein Schliffreagenzglas geben und am Rotationsverdampfer trocken destillieren. Den Rückstand mit 2,0 ml Wasser aufnehmen, davon 1,5 ml auf eine Austauschersäule mit Dowex 50 WX 8 (Packung 45 x 6 mm, mit HCl (1 mol/l) äquilibriert) geben. Nach dem Eindringen der Lösung mit 4,0 ml Wasser nachspülen, zum Eluieren 8,0 ml HCl (1 mol/l), gefolgt von 2,0 ml Wasser, aufgeben. Das Eluat in 50 ml Spitzkölbchen sammeln und am Rotationsverdampfer trocknen (Wasserbad: 60°C). Den Rückstand in 2,0 ml Puffer 1 b lösen, 0,5 ml in ein Schliffreagenzglas geben und Bestimmungsreaktion (s.u.) durchführen.

Probe und innerer Standard:

0,4 ml Probe und 0,4 ml Standardlösung (30,5 µmol/l) mischen. Protein mit 4,0 Ethanol fällen und abzentrifugieren. 4,0 ml des Überstandes am Rotationsverdampfer trocknen und weiterverarbeiten wie unter Probe.

Bestimmung von proteingebundenem Hydroxyprolin

0,4 ml Probe in ein verschraubbares Hydrolyseglass geben, das Protein mit 2,0 Ethanol fällen und abzentrifugieren. Den Überstand verwerfen oder zur Bestimmung der anderen Hydroxyprolinfraktionen verwenden. Den Niederschlag mit 2,0 ml Ethanol waschen. Zum Sediment 0,4 ml Wasser (Probe), bzw. 0,4 ml Standard (76,3 µmol/l = 10 mg/l) (= Probe und Standard) geben. 4,0 ml HCl (6 mol/l) zusetzen und 16 Stunden bei 105°C hydrolysieren. Das Hydrolysat filtrieren, 3,0 ml des Filtrats am Rotationsverdampfer trocknen. Den Rückstand mit 2,0 ml Wasser aufnehmen, 1,5 ml auf eine Dowex-Säule geben und weiterverarbeiten wie oben beschrieben.

Bestimmungsreaktion

Der Hydroxyprolingehalt in den vorbereiteten Lösungen wurde mit Hilfe der von Dabew & Struck beschriebenen Mikromethode bestimmt (5). Diese Methode bietet gegenüber einem früher beschriebenen Verfahren (6) den Vorteil der Anpassung an das Eppendorf-Mikrolitersystem. Es basiert auf der Vorschrift von Stegemann & Stalder (7); dabei wird zum Nachweis der Aminosäure die Farbreaktion von Pyrrol mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich-Reaktion) benutzt.

Die vorbereiteten, in 500 µl Puffer 1 b gelösten Proben werden in folgender Weise weiterbehandelt: 200 µl Lösung 2 zugeben, 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen, dann mit 200 µl Lösung 3 versetzen, 30 Sekunden schütteln und verschlossen 15 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubieren, mit Leitungswasser kühlen, 200 µl *n*-Propanol zugeben, schütteln und innerhalb von 45 Minuten im Spektralphotometer bei 546 nm gegen Reagenzienleerwert messen.

Auswertung

Für eine Bestimmung sollten mindestens doppelte Probenansätze vorbereitet werden. Nach Aufarbeitung der Proben wird der Hydroxyprolingehalt mit Hilfe von Doppelbestimmungen gemessen. Die Berechnung aus den Absorptionen (A_p = Absorption der Probe, A_s = Absorption des Standards) erfolgt gemäß der Gleichung:

$$\text{Hydroxyprolinkonzentration} = \frac{A_p}{A(p + s) - A_p} \times \text{Konzentrations}$$

Aus den Einzelwerten werden die Mittelwerte und die Standardabweichungen errechnet.

Ergebnisse

Die Genauigkeit der Methoden wurde durch die Bestimmung des Variationskoeffizienten in der Serie in einem menschlichen Sammelplasma, das von Blutspendern stammte, ermittelt (Tab. 1). Das Verfahren zur Bestimmung des freien Hydroxyprolin wurde bereits früher beschrieben und soll hier nicht beurteilt werden. Es interessiert lediglich der gemittelte Wert, da er zur Berechnung des peptidgebundenen Hydroxyprolin benötigt wird.

Während sich mit der Bestimmungsmethode für das freie Hydroxyprolin 3,83 µmol/l noch gut messen lassen, zeigen die Verfahren zur Erfassung des gebundenen Hydroxyprolin eine geringere Empfindlichkeit: Gut

Tab. 1. Gebundenes Hydroxyprolin im Humanplasma.

N	µmol/l	$\bar{x} \pm s$ (Serie)	VK % (Serie)	$\bar{x} \pm s$ (gesamt)
1. freies und peptidgebundenem Hydroxyprolin				
8	19,1 23,5 17,9 21,9 21,5 18,5 22,7 22,4	20,9 ± 2,12	10,1	20,1 ± 2,65 (2,70 ± 0,35 mg/l)
6	24,9 19,2 23,3 18,3 19,6 15,6	20,2 ± 3,40	16,8	
2. proteingebundenem Hydroxyprolin				
4	55,7 58,4 67,0 70,4	62,9 ± 6,96	11,1	62,8 ± 6,25 (8,23 ± 0,82 mg/l)
4	55,4 64,6 60,3 70,8	62,8 ± 6,54	10,4	

Die Bestimmung des freien Hydroxyprolin ergab 16,0 ± 0,54 µmol/l (2,09 ± 0,07 mg/l). Aus den gemessenen Daten wurden 4,62 µmol/l (0,61 mg/l) für das peptidgebundene und 83,4 µmol/l (10,9 mg/l) für das gesamte Hydroxyprolin berechnet.

Tab. 2. Hydroxyprolin im Rattenserum ($\mu\text{mol/l}$)

Dreifachbestimmungen aus Einzeleren etwa 3 Monate alter männlicher Wistar-Ratten.

Tier Nr.	frei	frei u. peptid- gebunden	peptidgebunden	proteingebunden	gesamt
1	32,3	36,6	4,35	71,9	109,0
2	37,2	43,9	6,71	61,4	105,3
3	38,1	58,2	19,5	53,6	111,8
4	35,2	38,8	3,51	68,7	107,5
5	36,9	41,2	4,27	46,5	87,7
6	38,8	40,0	1,14	60,3	100,2
7	37,8	44,9	7,02	80,9	125,8
\bar{x}	36,6	43,4	6,64	63,3	106,8
$\pm s$	2,21	7,13	6,01	11,6	11,6
mg/l	4,80	5,68	0,87	8,31	13,99

Tab. 3. Literaturvergleich: Hydroxyprolinfraktionen im Blut ($\mu\text{mol/l}$)

Autor	Material	frei	peptidgebunden	proteingebunden	gesamt
<i>Le Roy et al. (8, 9)</i>	A. Humanplasma				
	1. Neugeborenes			61,0	
	2. 14d-2a			96,1	
	3. 21-29a	11,4	4,58	61,8	77,8
	4. 30-49a			61,0	
	5. akute fiebrige Zustände			116,0	
	6. Hyperthyreoidismus			106,8	
	7. Sklerodermie			85,4	
	8. Rheumatische Arthritis			83,2	
	B. Rattenplasma			77,8	
<i>Kibrick et al. (10, 11, 12)</i>	A. Humanserum				
	1. 8a	15,5	9,31	51,6	76,3
	2. 20a	9,99	5,34	42,6	58,0
	3. Rheumatische Arthritis	11,4	6,00	61,9	79,3
	B. Rattenserum*	40,8	14,9	36,6	92,3
<i>Holzmann et al. (13)</i>	A. Humanserum				
	1. Nabelschnur			53,4	
	2. 20-60a			60,3	
	3. Sklerodermie			30,5	
<i>Struck, Nagelschmidt</i>	A. Humanplasma	16,0	4,62	62,8	83,4
	B. Rattenserum*	36,6	6,64	63,3	106,8

*) Tiere von 200-250 g Gewicht

meßbar sind bis zu $6,12 \mu\text{mol/l}$ freies und peptidgebundenes und bis zu $11,5 \mu\text{mol/l}$ proteingebundenes Hydroxyprolin.

Tabelle 2 gibt Aufschluß über die Konzentration der Hydroxyprolinfraktionen in Einzeleren von jungen Ratten.

Tabelle 3 zeigt, daß die von uns im Humanplasma ermittelten Werte in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren stehen. In Ergänzung sind einige pathologische Fälle aufgeführt, die mit Veränderungen des Hydroxyprolinspiegels einhergehen.

Diskussion

Die vorgestellten Verfahren basieren auf Methoden, die von den Arbeitsgruppen um *Le Roy* und *Kibrick* entwickelt wurden (8, 11). Grundprinzip ist die Abtrennung von störenden Substanzen mit Hilfe der Austauschchromatographie. Dies macht die Bestimmungsverfahren zwar aufwendig und diffizil, doch ist die Vorreinigung wegen der großen Störanfälligkeit der Farbreaktion mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd unbedingt erforderlich. Wichtig ist die Verwendung eines inneren Standards, da die Ausbeuten durch die Säulenchromatographie stark schwanken.

Darüberhinaus bedurfte die Reduzierung des Proben-
volumens von 2 ml auf 0,4 ml einer starken Variation
aller Analysenschritte.

Durch die Volumenreduzierung wird es möglich, die
Bestimmungsverfahren auch für Versuche an Klein-
tieren zu nutzen. Über die Genauigkeit der verschiedenen
bisher beschriebenen Methoden zur Erfassung des ge-
bundenen Hydroxyprolin gibt es in der Literatur nur
unvollständige Angaben. Der Grund liegt wohl in der
Aufwendigkeit der Verfahren, die es unmöglich macht,
Variationskoeffizienten in sehr großen Serien bzw. von
Tag zu Tag zu ermitteln. *Le Roy* und Mitarbeiter berich-
ten, daß Doppelbestimmungen nicht mehr als 3% Ab-
weichung zeigten. Dagegen läßt sich aus dem Zahlen-
material, das *Kibrick* et al. mit einer verbesserten Me-
thodik erhielten, ein Variationskoeffizient von 8,3% er-
rechnen. Hier wurde aber von 2 ml Probenlösung ausge-
gangen. Nach unseren Erfahrungen ist es kaum möglich,

mit Hilfe von Mikromethoden, die eine säulenchromato-
graphische Isolierung des Hydroxyprolin beinhalten,
in größeren Serien Variationskoeffizienten unterhalb
von 10% zu erzielen. Falls eine höhere Meßgenauigkeit
erforderlich wird, sollte man sich prinzipiell anders
geartete Meßverfahren wie z. B. die Gaschromatographie
zunutze machen (14).

Über die Aussagen, welche sich aus der vergleichenden
Bestimmung der Hydroxyprolinfraktionen in Harn und
Serum gewinnen lassen, werden wir an anderer Stelle
berichten.

Danksagung

Wir danken Frau *H. Frech* für die sorgfältige technische Assistenz.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft
unterstützt, der wir ebenfalls unseren Dank aussprechen.

Literatur

1. Müller-Eberhard, J. (1968), *Advan. Immunol.* 8, 1–80.
2. Calcott, M. A. & Müller-Eberhard, H. J. (1972), *Biochemistry* 11, 3443–3450.
3. Yonemasu, K., Stroud, R. M., Niedermeier, W. & Butler, W. T. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 1388–1394.
4. Reid, K. B. M., Lowe, D. M. & Porter, R. R. (1972), *Biochem. J.* 130, 749–763.
5. Dabew, D. & Struck, H. (1971), *Biochem. Med.* 5, 17–34.
6. Dabew, D. & Struck, H. (1969), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 7, 498–500.
7. Stegemann, H. & Stalder, K. (1967), *Clin. Chim. Acta* 18, 267–273.
8. Le Roy, E. C., Kaplan, A., Udenfriend, S. & Sjoerdsma, A. (1964), *J. Biol. Chem.* 239, 3350–3355.
9. Le Roy, E. C. & Sjoerdsma, A. (1965), *J. Clin. Invest.* 44, 914–919.
10. Kibrick, A. C. & Milhorat, A. T. (1969), *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 131, 1424–1425.
11. Kibrick, A. C., Bienenstock, H. & Singh, K. D. (1973), *Clin. Chim. Acta* 46, 173–180.
12. Kibrick, A. C., Kitagawa, G., Meskaleris, M. L., Gaines, R. & Milhorat, A. T. (1965), *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 119, 622–625.
13. Holzmann, H., Korting, G. W., Morsches, B. & Schlaudecker, A. (1967), *Arch. Klin. Exp. Dermatol.* 230, 69–83.
14. Mee, J. M. L. (1973), *J. Chromatography* 87, 155–161.

Prof. Dr. H. Struck
II. Chirurgischer Lehrstuhl
der Universität Köln
Biochemische Abteilung
Östmerheimer Straße 200
5000 Köln 91